Aus der IV. Med. Universitätsklinik des Robert-Koch-Krankenhauses, Berlin
Leiter: Prof. Dr. Dennig

Über das Vorkommen von blutgerinnungshemmenden Stoffen in Meeresalgen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität in Berlin

vorgelegt von

PAUL KAATZ

aus Kurzebrack

Tag der Promotion: 18. April 1940

Buchdruckerei Franz Linke, Berlin NW 7, Marienstr. 13

M 17

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Kreuz

Referent: Prof. Dr. Dennig

Korreferent: Prof. Dr. v. Bergmann

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern

Über das Vorkommen von blutgerinnungshemmenden Stoffen in Meeresalgen.

Inhalt:

I. Einleitung und Problemstellung.

II. Untersuchung einiger Algen auf gerinnungshemmende Stoffe.

III. Versuche, die Wirksamkeit des gerinnungshemmenden Algenstoffes zu erhöhen.

IV. Nachweis freier Schwefelsäure in der Meeresalge Desmarestia viridis, zugleich ein Beitrag über die Entstehung der gerinnungshemmenden Stoffe in den Algen.

V. Zusammenfassung der Ergebnisse.

VI. Literaturzusammenstellung.

VII. Lebenslauf.

I. Einleitung und Problemstellung.

Aus den Untersuchungen von H. Elsner und Mitarbeitern (3—6) ist bekannt, daß einzelne Meeresalgen wirksame Stoffe enthalten, die schon in verhältnismäßig großer Verdünnung die Blutgerinnung hemmen. Vor mir hat besonders E. Krauel (11) eine Reihe von Grün-, Braun- und Rotalgen auf die Gegenwart gerinnungshemmender Stoffe untersucht. In den wässrigen Auszügen von insgesamt 14 verschiedenen Algen konnte E. Krauel 1937 jedoch nur bei Delesseria sanguinea (L.) Lam. („Blutalge") eine beträchtliche und bei Chordaria flagelliformis eine geringfügige Wirkung auf die Blutgerinnung nachweisen. Da die Inhaltsstoffe der Meeresalgen je nach den Standorts- und Entwicklungsbedingungen schwanken, erschien es mir zunächst als wünschenswert, das Vorkommen eines gerinnungshemmenden Faktors an anderen Exemplaren der Rotalge Delesseria sanguinea, die im Jahre 1938 gesammelt wurden, zu bestätigen. Da die genannte Rotalge den gerinnungshemmenden Stoff nur zu bestimmten Zeiten enthält (6), habe ich einige weitere Meeresalgen untersucht, in der Hoffnung, noch ein besseres Ausgangsmaterial für die Darstellung heparinähnlich wirkender Präparate zu finden.

Herr Dr. A. Hoygaard (Oslo) hat in einer Privatmitteilung die Vermutung zum Ausdruck gebracht, daß die besonders im Winter auftretende Blutungsneigung der Eskimos (9) vielleicht darauf zurückzuführen sei, daß die Eskimos im Winter hauptsächlich auf Tangnahrung angewiesen sind. Bei einem hohen Gehalt der betreffenden Tangarten an gerinnungshemmenden Stoffen erschien ein Übergang dieser Stoffe ins Blut und damit eine erhöhte Blutungsbereitschaft nicht ausgeschlossen. Nach Mitteilung von Dr. Hoygaard besteht die Nahrung der Eskimos zur Hauptsache aus folgenden Algenarten: Rhodymenia palmata (L.) Grev., Ascophyllum nodosum (L.) Le Jol. und Alaria Pylaii. Grev. Nach H. Melchior (13, vgl. auch 15) kommen außerdem noch folgende Algen als Nahrungsmittel in Betracht: Ulva lactuca L., Alaria esculenta Grev., Laminaria-Arten, Porphyra laciniata Ag. Die Algen: Ascophyllum nodosum, Ulva lactuca, Laminaria saccharina und Porphyra laciniata waren bereits früher untersucht und unwirksam befunden worden (4, 6). Ich konnte mir jetzt auch die Braunlage Alaria esculenta Grev. beschaffen, die sich ebenfalls als unwirksam erwies. Am ehesten war die Anwesenheit

eines blutgerinnungshemmenden Faktors in der Rotalge Rhodymenia palmata zu erwarten, da alle bisher gefundenen stark wiksamen Algen (Chondrus crispus, Iridaea laminarioides, Delesseria sanguinea, Sebdenia monardiana) zu den Rhodophyceen gehören. Aber auch der wässrige Auszug von Rh. palmata war in bezug auf die Blutgerinnung wirkungslos. Nimmt man noch die Ergebnisse von Elsner, Liedmnan und Oppers (5) hinzu, die beim Kaninchen nach peroraler Darreichung eines gerinnungshemmenden Algenstoffes in relativ hohen Gaben nur eine geringfügige Verlängerung der Blutgerinnungszeit feststellen konnten, so wird die Erklärung der Hämoptysis bei Eskimos durch alimentäre Ursachen sehr zweifelhaft. Es war leider unmöglich, eine Probe der Tangnahrung aus Grönland für die Untersuchung zu erhalten.

Weitere Versuche (Abschnitt III) sollten dazu dienen, einen Weg zu finden, um die Wirksamkeit der Algenauszüge zu erhöhen. Schließlich beschäftigte ich mich noch mit der Frage, auf welche Weise die gerinnungshemmenden Stoffe in den Meeresalgen entstehen könnten. Die hierauf bezüglichen Versuche habe ich im Abschnitt IV dieser Arbeit zusammengestellt.

II. Untersuchung einiger Algen auf gerinnungshemmende Stoffe.

Die bei Helgoland vorkommenden Algen verdanke ich Herrn Dr. P. Kornmann von der Staatlichen Biologischen Anstalt auf Helgoland; die auf Jaeren gesammelten Algen erhielt ich von dem Forschungslaboratorium der Norwegischen Konservenindustrie, Stavanger; die aus dem Golf von Neapel stammenden Algen stellte die Zoologische Anstalt in Neapel zur Verfügung. Allen Beteiligten möchte ich auch an dieser Stelle für die Förderung meiner Arbeit verbindlichst danken. (Näheres über die betreffenden Algen findet man in der botanischen Literatur (vgl. 7, 14).

Zur Prüfung der Algen auf gerinnungshemmende Stoffe benutzte ich die auch von E. Krauel (11) angewendete Reagenzglasmethode.

Es wurden jeweils 5 g der getrockneten Alge mit 200 ccm destilliertem Wasser versetzt und unter Zugabe von 1 ccm Toluol drei bis vier Tage stehen gelassen. Die Flüssigkeit wurde täglich zwei- bis dreimal kräftig durchgeschüttelt und schließlich durch ein Saugfilter abfiltriert. Zur Prüfung des Einflusses auf die Blutgerinnung wurde menschliches Blut verwendet, das durch Venenpunktion entnommen und in einem paraffinierten, mit Eis gekühlten, dünnwandigen Glasgefäß schnell ins Laboratorium gebracht wurde. In sorgfältig mit

Chromschwefelsäure gereinigten Reagenzgläsern wurden jeweils 3 ccm des ungeronnenen Blutes mit 1 ccm der zu untersuchenden Algenlösung vermischt, und der Zeitpunkt der Gerinnung durch vorsichtiges, nicht zu häufiges (!) Neigen des Reagenzglases festgestellt. Die Gerinnungszeit wurde vom Beginn der Blutentnahme berechnet. Als Kontrollversuch wurden 3 ccm Blut mit 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt und auf dieselbe Weise die Gerinnungszeit bestimmt.

Von dem Filtrat wurden außerdem 100 ccm im Vakuum zur Trockene eingedampft und das Gewicht der Trockensubstanz ermittelt.

Das Filtrat des Algenauszuges wurde in folgenden Verdünnungen mit dest. Wasser verwendet:

1. unverdünnt,
2. Verdünnung 1 : 2 (1 Teil aq. dest. + 1 Teil Filtrat),
3. „ 1 : 4 (1 „ „ „ + 3 Teile Filtrat),
4. „ 1 : 8 (1 „ „ „ + 7 Teile Filtrat) usw.

Tabelle 1.

Untersuchung verschiedener Proben von Delesseria sanguinea.

Bezeichnung der Probe	g Trockensubstanz in 100 ccm Auszug	Gerinnungszeit				
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1:16	phys. NaCl
A (Helgoland Juli 1938)	0,6953	fl.	24 Stdn.	25m	15m	12m
B (Helgoland Juli 1938)	0,9520	fl.	24 Stdn.	60m	30m	15m
C (Helgoland 23. 7. 38)	0,6861	fl.	24 Stdn.	51m	20m	15m
D (Helgoland Juli 1938, nicht mehr ganz frisches Material)	0,5638	t. ger.	24 Stdn.	55m	24m	10m
E (Anfang bis Mitte April 1938)	1,0248	fl.	t. ger.	24 Stdn.	60m	17m
F (Preßrückstand)	0,7994	fl.	t. ger.	t. ger.	3 Stdn.	10m

Die Zimmertemperatur betrug bei diesen Versuchen 26°.
fl. bedeutet: noch flüssig nach 24 Stunden.
t. ger. bedeutet: teilweise geronnen nach 24 Stunden.
24 Stdn. bedeutet: geronnen nach 24 Stunden.
10m bedeutet: geronnen nach 10 Minuten.

Aus den Versuchen der Tabelle 1 geht hervor, daß alle in der Zeit April bis Juli 1938 auf Helgoland gesammelten Proben der Alge Delesseria sanguinea den blutgerinnungshemmenden Faktor enthalten.

Bei der Probe F war das Material im frischen Zustand unter hohem Druck ausgepreßt worden. Der verbliebene Preßrückstand ist deutlich wirksamer als die getrocknete Gesamtalge. Dies spricht dafür, daß der gerinnungshemmende Stoff nicht im Zellsaft gelöst, sondern an die Zellwandungen oder an das Plasma gebunden ist.

Weitere Algen, die ich mit negativem Erfolg auf eine gerinnungshemmende Wirkung untersucht habe, sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

Botanische Einteilung	Name der Alge	Fundort	Dat. des Einsammelns	g Trockensubstanz in 100 ccm Algenauszug
Rhodophyceae	Rhodymenia palmata (L) Grev. (bei 100° getrocknet)	Jaeren	7. 9. 38	—
„	Cryptonemia Lamation (Berth.) J. Ag.	Golf von Neapel	Juli 38	—
„	Phyllophora nervosa (DC) Grev.	Golf von Neapel	Juli 38	—
Phaeophyceae	Cystosira barbata J. Ag.	Golf von Neapel	Mai 38	0,8016
„	Alaria esculenta Grev. (im Vakuum bei 20° getrocknet)	Jaeren	9. 3. 39	—
„	Cystosira mediterranea (Ag.) Sauvageau	Golf von Neapel	Juli 38	—
„	Scytosiphon lomentarius (Lyngb.) J. Ag.	Helgoland	April 38	0,9130
Phaeophyceae	Dictyota dichotoma (Huds.) Lam. „Cornicella“	Golf von Neapel		0,8215
Chlorophyceae	Enteromorpha Linza (L.) J. Ag.	Helgoland	April 38	0,8565

III. Versuche, die Wirksamkeit des gerinnungshemmenden Algenstoffes zu erhöhen.

a) Da der Preßsaft aus Delesseria sanguinea in bezug auf die Blutgerinnung fast wirkungslos ist (6), während der Preßrückstand die in üblicher Weise getrocknete Alge an Wirksamkeit übertrifft

(vgl. Abschnitt II), muß der gerinnungshemmende Faktor im Plasma gelöst oder an die Zellwandungen gebunden sein. Ich versuchte deshalb wirksamere Präparate durch Autolyse der getrockneten Algen zu erhalten, ein Weg, der in der Enzymchemie vielfach zu guten Erfolgen geführt hat (1).

50 g getrocknete Blutalgen wurden gründlich zerkleinert und mit 50 ccm Toluol 30 Minuten lang verrührt. Das Gemisch wurde in einem Glasgefäß mit 200 ccm destilliertem Wasser versetzt und 48 Stunden bei 35° aufbewahrt. Nach 48 Stunden wurde das Reaktionsprodukt mit 400 ccm destilliertem Wasser 10 Minuten kräftig geschüttelt, filtriert, auf 200 ccm eingedampft, abermals filtriert und mit 500 ccm reinem Alkohol versetzt. Es entsteht ein weißflockiger Niederschlag. Dieser wird auf einem gehärteten Saugfilter abfiltriert und im evakuierten Exsikkator 48 Stunden getrocknet. Die Gesamtmenge des so gewonnenen Pulvers beträgt 5,6 g. Zur Prüfung der gerinnungshemmenden Wirkung stellte ich eine Lösung in destilliertem Wasser dar, die 8 mg in 1 ccm Lösung enthielt, und versetzte jeweils 1 ccm Lösung mit 3 ccm Blut:

unverdünnt ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 2 ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 4 ..... nach 24 Stunden teilw. geronnen,
1 : 8 ..... nach 24 Stunden teilw. geronnen,
Physiol. Kochsalzlösung ..... nach 15 Minuten geronnen.

Ein weiterer Versuch hatte folgendes Ergebnis:

unverdünnt ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 2 ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 4 ..... nach 24 Stunden teilw. geronnen,
1 : 8 ..... nach 24 Stunden geronnen.

Ein Vergleichsversuch mit einer nach dem bisherigen Verfahren durch Wasserextraktion gewonnenen Algenlösung hatte folgendes Ergebnis:

unverdünnt ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 2 ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 4 ..... nach 24 Stunden teilw. geronnen,
1 : 8 ..... nach 24 Stunden teilw. geronnen.

Vergleicht man die Ergebnisse, so kommt man zu der Feststellung, daß durch die veränderte Darstellungsmethode keine Steigerung der gerinnungshemmenden Wirkung eingetreten ist.

Auch die Ausbeute des Autolysen-Verfahrens (5,6 g aus 50 g getrockneten Blutalgen = 11,2%) steht weit hinter der Ausbeute

zurück, die beim dreitägigen Extrahieren der Algen mit der 40fachen Menge Wasser erhalten wird (ca. 12 g = 24%). Ein Vorteil des Autolysen-Verfahrens besteht darin, daß nur geringe Mengen Wasser im Vakuum eingedampft zu werden brauchen.

b) Ich versuchte nun, auf andere Weise zu wirksameren Präparaten zu kommen. Zu diesem Zwecke bediente ich mich des von H. Brintzinger (2) angegebenen Elektro-Schnelldialysators (Jenaer Glaswerk Schott und Gen.), von dem L. Heilmeyer und A. Sundermann (8, vgl. auch 10) eine ausführliche Beschreibung veröffentlicht haben. Zwischen den Membranen befand sich eine Lösung von 4 g des nach dem Autolysen-Verfahren gewonnenen Algenstoffes in 200 ccm destilliertem Wasser. Als Innenmembran diente Cuprophan (Nr. 15, farblos, Dicke 10 Mikron), als Außenmembran Cellophan (Nr. 300, farblos, Dicke 20 Mikron). Die Anode im Innenraum bestand aus einem Platindraht, für die am Boden des Außengefäßes liegende Kathode wurde ein Messingdrahtnetz verwendet. Während der Dialyse wurden in regelmäßigen Abständen einige Tropfen Toluol, insgesamt 7 ccm, zugegeben. Die Gesamtmenge der Spülflüssigkeit für Innen- und Außenmembran betrug 15 Liter. Die Dialyse nahm folgenden Verlauf (Tabelle 3):

Tabelle 3.

Zeit	Ampere	Volt
Beginn	0,3	220
30 Minuten	0,9	
60 „	0,8	
90 „	0,65	
120 „	0,47	
150 „	0,3	
180 „	0,21	
210 „	0,14	
225 „	0,11	215

Dauer: 3 Stunden, 45 Minuten.
Dialyseflüssigkeit: 260 ccm.

Unmittelbar nach Beendigung der Dialyse wurde mit dem Dialysat ein Gerinnungsversuch gemacht.

Gerinnungsversuch mit Dialyseflüssigkeit:

unverdünnt ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 2 ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 4 ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 8 ..... nach 24 Stunden teilw. geronnen,
Physiol. Kochsalzlösung ..... nach 15 Minuten geronnen.

Das Dialysat wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft. Die Gesamtmenge der Trockensubstanz betrug 2,6405 g gegenüber der Ausgangsmenge von 4,0 g. Durch die Dialyse trat also ein Substanzverlust von 1,3595 g ein. Berücksichtigt man die Flüssigkeitszunahme nach der Dialyse auf 260 ccm, so enthalten nach Beendigung der Dialyse 260 ccm 2,6405 g Trockensubstanz, entsprechend 1 ccm 0,010 g = 10 mg Trockensubstanz. Die Dialyseflüssigkeit enthält also pro 1 ccm etwa 2 mg Trockensubstanz mehr als die bei den früheren Versuchen (S. 8, 9) verwendete Lösung des unbehandelten Autolysepulvers, die nur 8 mg in 1 ccm enthielt.

Zum besseren Vergleich wurden deshalb von der Trockensubstanz des Dialysats eine wäßrige Lösung bereitet, die 8 mg in einem ccm enthielt, und deren gerinnungshemmende Wirkung mit der einer gleichkonzentrierten Lösung (8 mg in 1 ccm) des Autolysen-Pulvers verglichen.

Trockensubstanz nach der Dialyse (8 mg in 1 ccm Wasser):
unverdünnt ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 2 ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 4 ..... nach 7 Stunden geronnen,
1 : 8 ..... nach 7 Stunden geronnen,
Physiol. Kochsalzlösung ..... nach 20 Minuten geronnen.
Autolysepulver vor der Dialyse (8 mg in 1 ccm Wasser):
unverdünnt ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 2 ..... nach 24 Stunden flüssig,
1 : 4 ..... nach 24 Stunden geronnen,
1 : 8 ..... nach 24 Stunden geronnen,
Physiol. Kochsalzlösung ..... nach 20 Minuten geronnen.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß die gerinnungshemmende Wirkung durch Dialyse nicht erhöht wird. Die Löslichkeit der Substanz ist jedoch nach der Dialyse besser.

IV. Nachweis freier Schwefelsäure in der Meeresalge Desmarestia viridis, zugleich ein Beitrag über die Entstehung der gerinnungshemmenden Stoffe in den Algen.

Unter dem mir zur Verfügung gestellten Algenmaterial befand sich auch eine größere Menge Preßsaft aus der Braunalge Desmarestia viridis (Muell.) Lamour., die ich Herrn Dr. P. Kornmann von der Staatlichen Biologischen Anstalt auf Helgoland verdanke. Die lebende Alge ist gelbbraun, sie wird beim Absterben rasch grün, um sich dann zu zersetzen. Ursache für dieses Verhalten ist die ungewöhnlich

starke Acidität des Zellsaftes dieser Alge (12, 16). Für die P_H-Zahl des Preßsaftes verschiedener Desmarestia-Arten werden Werte zwischen 0,78 und 1,35 genannt (12, 16, Untersuchung von P. Kornmann). Von dem für die folgenden Versuche benutzten Preßsaft erforderten jeweils 10 ccm 25,88 ccm 0,1 -n Natronlauge zur Neutralisation. Wie die Versuche zeigen, besitzt der neutralisierte Preßsaft eine deutliche gerinnungshemmende Wirkung.

Tabelle 4.

	I	II
unverdünnt	nach 2 Stunden teilw. geronnen, nach 24 Stunden geronnen	nach 90 Min. fl. nach 24 Stunden geronnen
1 : 2	nach 20 Min. geronnen	nach 27 Min. ger.
1 : 4	„ 20 „ „	„ 20 „ „
Physiol. Kochsalzlösung	„ 20 „ „	„ 18 „ „

Es sei hier noch einmal hervorgehoben, daß der Preßsaft von der gut wirksamen Blutalge gar keine Gerinnungshemmung hervorruft. Es ist anzunehmen, daß auch bei Desmarestia viridis die Hauptmenge des wirksamen Faktors an die Zellwandungen gebunden ist. Den experimentellen Nachweis konnte ich hierfür nicht erbringen, da der Preßrückstand stets von dem stark sauren Zellsaft durchfeuchtet bleibt und sich während des Versandes schnell zersetzt.

Wirth und Rigg (16) hatten in den Preßsäften von Desmarestia latissima und Desmarestia intermedia bereits die Anwesenheit von freier Schwefelsäure wahrscheinlich machen können. Da H. Elsner (3, 4) die gerinnungshemmenden Bestandteile der Meeresalgen als Kohlenhydrat-Schwefelsäurerester ansieht, würde das Vorkommen freier Schwefelsäure im Zellsaft eine Erklärungsmöglichkeit für die Bildung dieser Stoffe in den Algen liefern. Es erschien mir deshalb wichtig, die Anwesenheit von freier Schwefelsäure in dem Preßsaft von Desmarestia viridis sicher nachzuweisen. Die ersten Versuche sollten zeigen, daß starke organische Säuren (Oxalsäure, Zitronensäure, Apfelsäure) in einer der P_H-Zahl entsprechenden Menge nicht vorhanden sind.

1. Verhalten des Calciumsalzes. Der Preßsaft gibt beim Versetzen mit Ammoniak eine geringe Trübung. Das ammoniakalische Filtrat bleibt nach Zusatz von Calciumchlorid-Lösung klar, beim Kochen scheidet sich jedoch ein kristallinischer Niederschlag ab. Dieser unterscheidet sich von Calciumcitrat und Calciumoxalat, das Aussehen spricht für Calciumsulfat.

2. Prüfung auf Zitronensäure. 5 ccm Preßsaft + 1 ccm Schwefelsäure wurden in einem Destillierkölbchen bei Siedetemperatur solange tropfenweise mit Kaliumpermanganat-Lösung versetzt, bis keine Entfärbung mehr eintrat. Das Destillat gibt mit Natronlauge und Jod-Jodkalium-Lösung kein Jodoform. Zur Kontrolle wurde die Hälfte des mit Natronlauge und Jodlösung versetzten Destillats abgetrennt und eine Spur Aceton zugefügt; hierbei trat sofort eine stark positive Reaktion ein. — Eine Wiederholung des Versuches mit 10 ccm Algenpreßsaft verlief ebenso negativ.

3. Kontrollversuch mit künstlich zugesetzter Zitronensäure. Als weitere Kontrolle wurden auf je 5 ccm Preßsaft 10 bzw. 15 mg reine Zitronensäure (pro analysi) zugesetzt. Der Gehalt an Zitronensäure betrug also 0,2 bzw. 0,3 Prozent. Es wurde wie unter 2. mit Kaliumpermanganat oxydiert und destilliert. In beiden Fällen gab das Destillat eine sehr deutliche positive Jodoform-Reaktion.

4. Farbreaktion auf Apfelsäure. 5 bzw. 10 Tropfen Preßsaft wurden mit 2 ccm konz. Schwefelsäure und etwas Resorcin 5 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, dann abgekühlt, mit 10 ccm Wasser verdünnt, wieder abgekühlt und tropfenweise mit Ammoniak versetzt. In beiden Fällen trat eine schwache blaue Fluorescenz ein.

Die Versuche 1. bis 4. zeigen, daß Oxalsäure und Zitronensäure höchstens in Spuren vorhanden sein können. Auch die Farbreaktion auf Apfelsäure ist so schwach, daß diese höchstens einen kleinen Teil der Acidität verursachen kann.

5. Nachweis freier Schwefelsäure. Sulfationen ließen sich mit den üblichen Reagenzien qualitativ nachweisen. Um zu ermitteln, ob neben der Schwefelsäure noch höher molekulare organische Säuren, zum Beispiel Polysaccharidschwefelsäuren, vorhanden sind, wurde der Desmarestia-Preßsaft in dem Elektro-Schnelldialysator nach Brintzinger dialysiert. Während die Sulfationen zur Anode wandern, war zu erwarten, daß etwa vorhandene höhermolekulare Anionen die Cuprophan-Membran nicht passieren können. Dialysiert wurden 350 ccm Preßsaft. Die Dialyse nahm folgenden Verlauf:

Tabelle 5.

Zeit	Ampere	Volt
Beginn	1,40	220
30 Minuten	1,44	
60 „	1,18	
90 „	1,13	
120 „	1,10	
150 „	1,10	
165 „	1,10	220

Dauer: 2 Stunden, 45 Minuten.
Dialyseflüssigkeit: 400 ccm.
Anodenflüssigkeit: 300 ccm.
Kathodenflüssigkeit: 7 l.

Die Spülflüssigkeit des Anodenraums wurde auf 500 ccm aufgefüllt.

a) Titration der Anodenflüssigkeit. 25 ccm der auf 500 ccm aufgefüllten Anodenflüssigkeit verbrauchten 15,70 ccm 0,1-n. Natronlauge. Die gesamte Anodenflüssigkeit (500 cmm) hätte demnach 15,7 · 20 ccm verbraucht. Angesetzt waren nur 350 ccm Preßsaft; auf 1000 ccm Preßsaft berechnet erhält man einen Verbrauch von $\frac{15,7 \cdot 20 \cdot 100}{35}$ ccm 0,1-n. Natronlauge, entsprechend 4,399 g Schwefelsäure = 0,44%. 10 ccm des nicht dialysierten Preßsaftes verbrauchen 25,88 ccm 0,1-n. Natronlauge, entsprechend 1,27% Schwefelsäure. Da in der Anodenflüssigkeit nur etwa ein Drittel der Säure wiedergefunden wurde, müssen in dem Rohpreßsaft höhermolekulare Säuren vorhanden sein, die die benutzte Cuprophan-Membran nicht passieren können.

b) Bestimmung der Schwefelsäure im Anodenraum als Bariumsulfat. Es sollte nur noch bewiesen werden, daß die Acidität der Anodenflüssigkeit ausschließlich auf den Gehalt an Schwefelsäure zurückzuführen ist, daß also im Preßsaft von Desmarestia viridis tatsächlich freie Schwefelsäure vorkommt. Es wurde deshalb in einem Teil der auf 500 ccm aufgefüllten Anodenflüssigkeit die Schwefelsäure mit Bariumchlorid als Bariumsulfat bestimmt: 100 ccm lieferten 0,7214 g Bariumsulfat. Nach der gleichen Rechnung wie bei a) ergibt sich für 1000 ccm Preßsaft $\frac{0,7214 \cdot 5 \cdot 1000}{35}$ g Bariumsulfat, entsprechend 4,329 g Schwefelsäure = 0,43%.

Aus der guten Übereinstimmung der Werte bei der Titration (Wasserstoffionen-Konzentration) und bei der Bariumchlorid-Fällung (Sulfationen-Konzentration) ergibt sich, daß ein Drittel der Gesamtacidität des Desmarestia-Preßsaftes auf die Anwesenheit freier Schwefelsäure zurückgeführt werden muß.

c) Wiederholung der Dialyse. Bei einem Parallelversuch mit 500 ccm Preßsaft nahm die Dialyse folgenden Verlauf:

Tabelle 6.

Zeit	Ampere	Volt
Beginn	1,15	220
30 Minuten	1,25	
60 „	1,25	
90 „	1,20	
120 „	1,13	
150 „	1,08	
180 „	1,05	220

Dauer: 3 Stunden.
Dialyseflüssigkeit: 580 ccm.
Anodenflüssigkeit: 1,026 ccm.
Kathodenflüssigkeit: 13 l.

Titration: 25 ccm Anodenflüssigkeit verbrauchen 12,69 ccm 0,1-n. Natronlauge. 100 ccm der Anodenflüssigkeit lieferten 0,4748 g Bariumsulfat; in guter Übereinstimmung mit dem vorhergehenden Versuch ergibt sich aus dem letztgenannten Wert für den Preßsaft ein Gehalt von

0,41% Schwefelsäure.

Schlechter stimmte jedoch das Ergebnis der Titration, aus der sich ein Gehalt von 0,51% Schwefelsäure errechnet. Infolge eines Mißgeschicks konnte diese Bestimmung leider nicht wiederholt werden.

Der einwandfreie Nachweis von freier Schwefelsäure im Preßsaft von Desmarestia viridis ist biologisch außerordentlich interessant, da er einen Hinweis dafür bildet, wie die blutgerinnungshemmenden Stoffe in den Meeresalgen entstehen. Die — vielleicht durch besondere Permeabilitätsverhältnisse in den Zellen angesammelte freie Schwefelsäure verbindet sich mit den Polysacchariden der Zellwände zu Polysaccharid-Schwefelsäuren, die zum Teil im Zellsaft gelöst sind und dessen Acidität vergrößern.

Ein weiterer Teil der Polysaccharid-Schwefelsäureester, der vermutlich noch höhermolekular ist, wird erst nach dem Absterben der Zelle durch Wasser extrahierbar; diese Anteile sind es, die vornehmlich die gerinnungshemmende Wirkung auslösen.

V. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Der Befund von E. Krauel über das Vorkommen eines gerinnungshemmenden Faktors in der Rotalge Delesseria sanguinea (L.) Lam. wird bestätigt; der wirksame Stoff ist nicht im Zellsaft gelöst, sondern an Zellwand oder Plasma gebunden.

2. Eine Reihe weiterer Algen wurde mit negativem Ergebnis auf einen Gehalt an gerinnungshemmenden Stoffen untersucht. Nach diesen Befunden bleibt wenig Grund für die Annahme, daß die im Winter bei den Eskimos auftretende Blutungsneigung als alimentäre Ursachen zurückzuführen ist.

3. Es gelang nicht, durch Änderung der Darstellungsbedingungen oder durch Elektrodialyse der Rohextrakte wirksamere gerinnungshemmende Präparate zu erhalten.

4. In dem Preßsaft der gerinnungshemmend wirkenden Braunalge Desmarestia viridis konnte freie Schwefelsäure nachgewiesen werden. Damit bietet sich eine Erklärungsmöglichkeit für die Entstehung der gerinnungshemmend wirkenden Kohlehydrat-Schwefelsäureester in den Meeresalgen.

Herrn Dr. H. Elsner bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit und die Unterstützung bei ihrer Durchführung besonders dankbar.

VI. Literaturzusammenstellung:

1. Th. Bersin, Kurzes Lehrbuch der Enzymologie (Leipzig 1938), S. 12.
2. H. Brintzinger, A. Rothaar und H. G. Beier, Koll. Z. **66**, 183 (1934).
3. H. Elsner, W. Broser und E. Bürgel, Z. physiol. Chem. **246**, 244 (1937).
4. H. Elsner, Z. physiol. Chem. **252**, 196 (1938).
5. H. Elsner, A. Liedmann, K. Oppers, Naunyn-Schmiedebergs Arch. **190**, 510 (1938).
6. Noch unveröffentlichte Versuche von H. Elsner und Mitarbeitern.
7. G. Funk, Die Algenvegetation des Golfs von Neapel, Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli. Vol. 7 Suppl. (Rom-Berlin 1927).
8. L. Heilmeyer und A. Sundermann, Dtsch. Arch. klin. Med. **178**, 398 (1936).
9. A. Hoygaard, The Lancet **1938**, 758.
10. L. Kratz, Koll. Z. **80**, 33 (1937).
11. E. Krauel, Über das Vorkommen von hochwirksamen, die Blutgerinnung hemmenden Stoffen in Meeresalgen. Diss. Berlin, 1938.
12. H. Kylin, Planta **27**, 645 (1938); Chem. Ztrbl. **1938** I, 4066.
13. H. Melchior in J. v. Wiesner, Die Rohstoffe des Pflanzenreichs, 4. Aufl. (Leipzig 1928), S. 1831, 1855.
14. D. W. Migula, Meeresalgen und Armleuchter-Gewächse (Stuttgart 1922).
15. C. Sauvageau, Utilisation des Algues marines (Paris 1920).
16. H. E. Wirth und G. B. Rigg, Am. Journ. of Bot. 24, 68 (1937).

VII. Lebenslauf.

Ich bin am 1. Juli 1911 als Sohn des Kaufmannes Robert Kaatz in Kurzebrack (Kr. Marienwerder, Westpreußen) geboren. Nach im März 1930 bestandener Reifeprüfung am Realgymnasium zu Marienwerder Westpr. studierte ich zuerst Philosophie und Rechtswissenschaften an den Universitäten München, Freiburg i. Br. und Berlin. Seit dem Winter 1934 studierte ich Medizin an den Universitäten Freiburg, Heidelberg und Berlin. In Heidelberg bestand ich im Juni 1935 den ersten und in Berlin im Oktober 1936 den zweiten Teil der ärztlichen Vorprüfung. Im April 1939 begann ich in Berlin mit dem Staatsexamen. Vor Beendigung des Examens wurde mir bei Kriegsbeginn am 4. September 1940 die vorzeitige Approbation erteilt. Vom 1. 10. 1939 bis 1. 1. 1940 arbeitete ich als Polizeivertragsarzt auf der geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung des Staatskrankenhauses der Polizei in Berlin. Am 3. 1. 1940 wurde ich zum Heer einberufen. Während eines Urlaubs von Anfang März bis Mitte April 1940 beendete ich das Doktor-Examen (Rigorosum).